



**The Kingdom of Thailand  
Ministry of Commerce  
Department of Intellectual Property**

**Certificate**

The attached documents are exact copies of the Thai Patent application described on the following page, as originally filed.

Application Number : 075425

Filing Date : July 26 , 2002



Bangkok



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

 การประดิษฐ์

- การออกแบบผลิตภัณฑ์  
 อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ดูแลรายนี้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้  
 ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522  
 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535  
 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

## สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ	26 ก.ค. 2545	เลขที่คำขอ	075425
วันยื่นคำขอ			

สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

## ให้กับแบบผลิตภัณฑ์

## ประเภทผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา

เลขที่ประกาศโฆษณา

วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
------------------------------	------------------------------

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

## 1. ข้อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/ความอุตสาหกรรมแบบผลิตภัณฑ์

"เชื้อไวรัสเดิงกีตัดแปลง สายพันธุ์ MBU 01-2002"

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์ที่เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่  
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศไทย)  
 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ  
 111 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหมื่น แขวงคลองหลวง  
 จังหวัดปทุมธานี 12120 และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย เลขที่ 979  
 อาคาร SM Tower ชั้น 14 ถ.พหลโยธิน สามเสนใน พญาไท กรุง. 10400

3.1 สัญชาติ ไทย

3.2 โทรศัพท์ 02-564-7000

3.3 โทรสาร 02-564-7003

3.4 อีเมล์ ips@nstda.or.th

## 4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ  ผู้รับโอน  ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

## 5. ตัวแทน (ร้าม) ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)

นายเกรียงศักดิ์ ก้อนทอง และ/หรือ นายกานกศักดิ์ ทองพาณิชย์ และ/หรือ นายเฉลิมชัย กิกเกียรติฤทธิ์ และ/หรือ นางวรารณ์ วิชชารัตน์ และ/หรือ น.ส. อรุณศรี ศรีอรุณรัตน์  
 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ  
 111 ถนนพหลโยธิน แขวงคลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

5.1 ตัวแทนเลขที่ 383,1046,1468,1193,1463

5.2 โทรศัพท์ 02-564-7000

5.3 โทรสาร 02-564-7003

5.4 อีเมล์ ips@nstda.or.th

## 6. ผู้ป่วยชีวะ/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศไทย)

อยู่ที่หน้า 3

## 7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร  
 เลขที่ วันยื่น เพื่อจะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพาะ

คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง  ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ  ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในการนี้ที่ไม่อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย



ชื่อผู้ประดิษฐ์ และที่อยู่

1. นางพูนสุข กีฬาแปง

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

113 ถนนพหลโยธิน ต.คลองน้ำเงิน อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

2. นายนพพร ลิทธิสมบัติ

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

3. นายวชระ กลินฤกษ์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

4. นายปรีดา มาลาสิทธิ์

คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

## รายละเอียดการประดิษฐ์

### ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

เชื้อไวรัสเดิงก์ดัดแปลงสายพันธุ์ MBU 01-2002

### ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์โดยย่อ

- 5 การประดิษฐ์นี้คือ เชื้อไวรัสใช้เลือดออกเดิงก์ซึ่งถูกดัดแปลงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน pM โดย เทคนิคทางพัฒนาชีวกรรม จนส่งผลให้เชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้ มีระดับโปรตีน pM บนผิวอนุภาคที่ถูกปล่อยออก นอกเซลล์ลดต่ำลง และมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณในเซลล์เพาะเลี้ยงต่ำกว่าเชื้อไวรัสที่พบในธรรมชาติ ซึ่งก่อให้เกิดโรคไข้เลือดออกในคน

### 10 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ พันธุวิศวกรรม และ จุลชีววิทยา

### ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- 15 เชื้อไวรัสเดิงก์ เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้เลือดออกในคน โรคนี้แพร่ระบาดทั่วไปในประเทศไทย และประเทศในแถบเขตร้อน การติดเชื้อไวรัสเดิงก์มีอย่างลâyเป็นพานะ เชื้อไวรสนี้สามารถจัดเป็น 4 กลุ่ม ด้วยคุณสมบัติทางชีรัมวิทยา การติดเชื้อครั้งแรกมักก่อให้เกิดโรคที่ไม่รุนแรงและรักษาได้ด้วยยา แต่การติดเชื้อข้ำด้วยไวรัสเดิงก์ก่อสูญอื่น ๆ มักทำให้ผู้ได้รับติดเชื้อมีอาการไข้ มีเลือดออกตามผิวนังและอวัยวะภายในจนอาจถึงแก่ความตายได้ การป้องกันจำเป็นต้องสร้างภูมิคุ้มกันให้ ร่างกายต่อเชื้อไวรัสทั้ง 4 กลุ่มได้

- 20 เชื้อไวรัสเดิงก์อยู่ในตระกูล Flaviviridae อนุภาคเป็นทรงกลมขนาดเล็กผ่านศูนย์กลางประมาณ 50 นาโนเมตร ผิวนอกเป็นชั้นของไขมันที่มีโปรตีนของไวรัสสองชนิดฝังอยู่โดยรอบ เรียกว่าโปรตีน envelope หรือ โปรตีน E และโปรตีน matrix หรือโปรตีน M ภายใต้ชั้นไขมันมีโปรตีน capsid หรือโปรตีน C ทำหน้าที่ห่อ หุ้มสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไว้ภายใน สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดิงก์เป็น RNA ยาวประมาณ 10.7 กิโลเบส จำนวน 1 สาย ซึ่งมีข้อมูลกำหนดการสร้างโปรตีนทั้งหมดของไวรัสทั้งในส่วนที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง ของไวรัส (E, pM/M และ C) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง แต่มีส่วนช่วยในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสใน 25 เซลล์ อนุภาคของไวรัสเดิงก์ที่สร้างขึ้นใหม่ในเซลล์จะมีโปรตีน pM และโปรตีน E ที่ผิวนอก ระหว่างที่ไวรัส ถูกขนส่งออกจากเซลล์ โปรตีน pM บนผิวอนุภาคจะถูกเปลี่ยนไปเป็นโปรตีน M โดยการทำลายของเอนไซม์ใน กสุ่ม protease ที่มีอยู่ใน Golgi apparatus ผลให้ได้ออนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์พร้อมที่จะเพิ่มจำนวนในเซลล์ใหม่

- 30 เนื่องจากเชื้อไวรัสเดิงก์สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ไม่ดีนัก การผลิตวัคซีนโดยใช้เชื้อ ไวรัสที่ถูกทำให้ตายแล้ว (inactivated) ก่อนนำไปฉีดเข้าไปในคน เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมา จึงไม่เป็นที่นิยม เพราะภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมักเกิดในช่วงเวลาสั้น ๆ และจำเป็นต้องจัดกระตุ้นหลายเข็ม จึง จะได้ผล วิธีที่ได้มีการศึกษามากก็มีการดัดแปลงสารพันธุกรรมของไวรัสเพื่อให้เชื้อไวรัสอ่อนกำลังลง (attenuated) ซึ่งมักอาศัยปริมาณไวรัสในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน การสร้างเชื้อไวรัสที่อ่อน

กำลังลงมือทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสสายฯ รอบ (serial passage) ในห้องปฏิบัติการจนเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในตัวແນ่งที่สำคัญและส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ในปัจจุบันเชื้อไวรัสเดิงกีที่มีศักยภาพที่ดีที่สุดสำหรับนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก คือ สายพันธุ์ PDK-53 เป็นเชื้อไวรัสเดิงกีที่ถูกกล่าวขานมายาวนานที่สุด 16681 โดยผ่านการเพาะเลี้ยงใน certified primary dog kidney (PDK) cell เป็นจำนวน 53 รอบ ทำให้ได้เชื้อไวรัสที่มีการเพิ่มจำนวนในเซล LLC-MK2 ได้ลดลง และสามารถเพิ่มจำนวนที่อุณหภูมิสูงได้ไม่ติด การศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส PDK-53 นี้พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในลำดับเบสที่เป็นตัวແນ่งสำคัญอยู่เพียง 3 ตัวແນ่ง จึงเป็นการสืบสืบทอดต่อที่สำคัญ สำหรับผู้ที่จะได้รับวัคซีนที่มีองค์ประกอบของเชื้อไวรัสดังกล่าว เพราะเชื้อไวรัสเมื่อถูกสกัดกั๋วจะเป็นเชื้อไวรัสก่อให้เกิดโรคที่มีอาการรุนแรงขึ้นอีกได้โดยง่าย

การประดิษฐ์นี้จึงได้พัฒนาเชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ขึ้นใหม่ โดยอาศัยเทคนิคพันธุ์วิศวกรรมในการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มกรดอะมิโนดีน 9 ตัวແນ่ง ในบริเวณที่มีความสำคัญต่อขบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส โดยเฉพาะที่ขั้นตอนอย่าง (maturation) ของเชื้อไวรัส กล่าวคือเป็นบริเวณของโปรตีน prM ที่จะถูกตัดตัวโดยเอนไซม์ furin จนเปลี่ยนไปเป็นโปรตีน M ในอนุภาคที่สมบูรณ์ของไวรัส การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวส่งผลให้ประสิทธิภาพของการสร้างไวรัสที่สมบูรณ์ถูกปรับเปลี่ยนไป ทำให้ได้ไวรัสที่มีปริมาณโปรตีน prM บนผิวของอนุภาคลดน้อยลง แต่มีความสามารถในการเข้ากันได้เขลุยงที่ติดเชื้อเกิดการหลอมรวมตัวกันได้มากกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่าเชื้อไวรัสที่ได้มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ลดต่ำลงคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ PDK-53 ข้อดีของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้คือ โอกาสในการกลายพันธุ์จากกลับไปมีรหัสพันธุกรรมเหมือนเชื้อไวรัสต้นตอได้ยาก เพราะต้องเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเป็นจำนวนมากในบริเวณดังกล่าว ทำให้เชื้อไวรัสที่พัฒนาขึ้นใหม่มีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นแอนติเจนในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันหรือพัฒนาเป็นวัคซีนในคนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดิงกี หรือการเกิดโรคไข้เลือดออกได้อย่างปลอดภัย

#### การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ถูกสร้างขึ้นโดยการตัดแปลงสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสต้นตอ สายพันธุ์ 16681 ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่แยกจากผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกชาวไทย การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนถูกออกแบบให้มีการเปลี่ยนแปลงในส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีน prM บริเวณหน้าต่อตัวແเน่งตัดของเอนไซม์ furin (prM-M junction) โดยมีขั้นตอนการประดิษฐ์ดังนี้

- ทำการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง 666 เปลี่ยนจาก T ไปเป็น A, ตำแหน่ง 709 เปลี่ยนจาก A ไปเป็น G และ ตำแหน่ง 714 เปลี่ยนจาก A ไปเป็น C ใน cDNA ของเชื้อไวรัสเดิงกี โดยการทำ PCR-based และ site-directed mutagenesis ทำให้มี restriction enzyme recognition sequence สำหรับเอนไซม์ Nde I และ BamHI เพิ่มขึ้นมาที่ตำแหน่ง 666 และ 709 ของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตามลำดับ
- ออกแบบโอลิโกลิกอินวัคซิล์ให้เข้ามาสองสาย ให้มีลำดับเบสดังต่อไปนี้
 

5' TATGGACGGTGCACGCGGACCAGGCATTCCAAGAGATCTAGGA 3' (sense primer)

5' GATCTCCTAGATCTCTTGAATGCCCTGGTCCGCGTGCTCCGTCCA 3' (anti-sense primer)

3. นำโอลิโกนิวคลีอไกเดที่สังเคราะห์ขึ้นทั้งสองสายมาผสานกันในสภาวะที่เหมือนสม จะได้เอ็นเอสีสายสั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งสามารถเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Nde I อีกด้านสามารถเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ BamHI นำสายดีเอ็นเอกดงกล่าวนี้ไปเชื่อมกับพลาสมิดดีเอ็นเอที่มี Dengue cDNA (จากข้อ 1) และถูกกำจัดออกจากดีเอ็นเอตั้งแต่ตำแหน่งที่ 666 ถึง 709 ออกแล้วด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ NdeI และ BamHI
  4. จากนั้นทำการเตรียมพลาสมิดที่มี cDNA กำหนดการสร้างสารพันธุกรรมทั้งสิ่นของเชื้อไวรัสตัวใหม่ (full-length cDNA clone) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโนดังต่อไปนี้
    - 4.1 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 193 เปลี่ยนจาก threonine ไปเป็น arginine
    - 4.2 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 196 เปลี่ยนจาก threonine ไปเป็น arginine
    - 4.3 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 197 เปลี่ยนจาก methionine ไปเป็น threonine
    - 4.4 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 198 เปลี่ยนจาก glycine ไปเป็น arginine
    - 4.5 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 199 เปลี่ยนจาก glutamic acid ไปเป็น histidine
    - 4.6 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 200 เปลี่ยนจาก histidine ไปเป็น serine
    - 4.7 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 201 เปลี่ยนจาก arginine ไปเป็น lysine
    - 4.8 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 203 เปลี่ยนจาก glutamic acid ไปเป็น serine
    - 4.9 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 204 เปลี่ยนจาก lysine ไปเป็น arginine
- จะได้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดิมที่สายพันธุ์ MBU 01-2002 (full-length cDNA clone) ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ prM-M junction จนปราศจากการดีเอ็นเอที่มีประจุลบภายใน 13 กรดอะมิโนหน้าต่อจุดตัดนี้ และมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเพิ่มมากขึ้นอีก 3 หน่วยประจุ/
5. ทำการสร้าง RNA จากแม่แบบ cDNA (ข้อ 4) ในหลอดทดลอง ด้วยการทำางานของเอนไซม์ SP6 RNA polymerase ในสภาวะที่มี Cap analog ในความเข้มข้น 4 mM โดยประมาณ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
  6. นำ RNA ที่สร้างขึ้นในหลอดทดลองไปสักดัดแยกให้บริสุทธิ์ขึ้น ก่อนที่จะนำไปเหนี่ยวนำเข้าสู่เซลล์ยุงเพลี้ยง C6/36 โดยใช้ lipofectin เป็นตัวช่วยพา เลี้ยงเซลล์ยุงเพลี้ยง C6/36 ไว้ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส และตรวจพบเชื้อไวรัสที่เพิ่มจำนวนในเซลล์ ปล่อยออกมารากเซลล์ และอยู่น้ำเพลี้ยงเซลล์ภายนลังจากการเหนี่ยว RNA เข้าไปในเซลล์ โดยเริ่มตรวจพบตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไปและมีปริมาณสูงประมาณวันที่ 7 จึงได้เก็บไวรัสในน้ำเพลี้ยงไว โดยผสานน้ำเพลี้ยงกับ fetal bovine serum ให้ได้ความเข้มข้น 20% โดยประมาณ และแช่ไวรัสไว้ในตู้แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
  7. ตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่อยู่ในน้ำเพลี้ยง พนวณว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนตามที่ได้ออกแบบไว้ทุกประการ
  8. สภาวะที่เหมาะสมของการเพลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้คือ นำเชื้อไวรัสมาผสมกับเซลล์ยุงเพลี้ยง C6/36 ในอัตราส่วนไวรัส/เซลล์เท่ากับ 1 – 10 อนุภาค/100 เซลล์ ในปริมาตร 1 – 2 มล แล้วปล่อยให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำเพลี้ยงให้มีปริมาตร 5 – 15 มล และเลี้ยงเซลล์ยุงเพลี้ยง C6/36 ไว้ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เก็บเชื้อไวรัสที่

ปล่อยออกมานำจากเซลล์ในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อมีปริมาณสูงไวรัสเพียงพอ โดยผสมน้ำเพาะเลี้ยงกับ fetal bovine serum ให้ได้ความเข้มข้น 20% โดยประมาณ และแช่ไวรัสไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

9. คุณลักษณะของเชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ที่พัฒนาขึ้นใหม่วัดดังนี้

- 5 9.1 เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ prM-M junction จนปราศจากการตอบสนองที่มีประจุลบภายใน 13 กรดอะมิโนหน้าต่อๆกันตั้งแต่ 5 และมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเพิ่มมากขึ้นอีก 3 หน่วยประจุ
- 10 9.2 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ต่ำกว่าเชื้อต้นตอประมาณ 10-1000 เท่า ทั้งในเซลล์ยุง C6/36, เซลล์ใต้สุกร PS clone D, เซลล์เดลิง Vero และ เซลล์คน HEK 293T
- 15 9.3 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 มีโปรตีน prM ที่ผิดตัวบนออกซิเจนของอนุภาคในปริมาณต่ำกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ และโปรดตีน prM ที่คงเหลือประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเพิ่มมากกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ
- 20 9.4 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 สามารถซักก้นได้เซลล์ยุงเพาะเลี้ยง C6/36 ที่มีเชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนอยู่เกิดการลดลงรวมตัวกันเป็นเซลล์ที่ใหญ่ขึ้น ทั้งในสภาพะที่เป็นกลาง ( $\text{pH} 7.0$ ) และสภาพะที่เป็นกรด ( $\text{pH} < 7.0$ ) ในขณะที่เชื้อไวรัสต้นตอย่างเป็นต้องอาศัยสภาพะที่เป็นกรด ( $\text{pH} < 7.0$ ) เพ่านั้น
- 25 9.5 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 สามารถซักก้นได้เซลล์ยุงเพาะเลี้ยง C6/36 ลดลงรวมตัวได้ดีที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส แต่ความสามารถดังกล่าวลดต่ำกว่าเชื้อต้นตอเมื่อศึกษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการลดลงรวมตัวกันนี้เป็นกลไกหนึ่งทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อตายเร็วขึ้น เมื่อเซลล์ที่ติดเชื้อถูกทำลาย ทำให้จำนวนไวรัสลดลง
- 9.6 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 มีความสามารถในการจับกับเซลล์ใต้สุกรและเซลล์คนได้ไม่แตกต่างจากเชื้อไวรัสต้นตอ
- 9.7 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 มีความสามารถในการเข้าเพิ่มจำนวนในเซลล์ยุงและเซลล์ใต้สุกรไม่ต่างกับเชื้อไวรัสต้นตอย่างมีนัยสำคัญ
- 9.8 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 สามารถเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ใต้สุกรเพาะเลี้ยงได้เท่า ๆ กับเชื้อไวรัสต้นตอแต่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณต่ำกว่า

กรรมวิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

กรรมวิธีการประดิษฐ์ที่ได้กล่าวมาข้างต้นเป็นกรรมวิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

### ข้อถือสิทธิ

1. เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ prM-M junction บนปราศจากกรดอะมิโนที่มีประจุลบภายใน 13 กรดอะมิโนหน้าต่อจุดตัดนี้ และมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเพิ่มมากขึ้นอีก 3 หน่วยประจุ
- 5 2. เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถือสิทธิที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ มีระดับโปรตีน prM บนผิวอนุภาคที่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ลดน้อยกว่าเชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์อื่น
3. เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถือสิทธิที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ มีความสามารถในการซักนำให้เซลล์ยุงที่ติดเชื้อเกิดการหลอมรวมตัวมากกว่าเชื้อต้นตอที่อุณหภูมิประมาณ 29 องศาเซลเซียส แต่ความสามารถนี้ลดต่ำลงที่ 40 องศาเซลเซียส
- 10 4. เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถือสิทธิที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ จะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อได้น้อยกว่าเชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์อื่น และทำให้ระดับของไวรัสนอกเซลล์ต่ำกว่าปกติ
5. เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถือสิทธิที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ มีความสามารถในการจับกับเซลล์ต่อมสุกรและเซลล์คนได้ไม่แตกต่างจากเชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์อื่น
6. เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถือสิทธิที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ มีความสามารถในการเข้าเพิ่มจำนวนในเซลล์ยุงและเซลล์ต่อมสุกรไม่ต่างกับเชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญ
- 15 7. เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถือสิทธิที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ สามารถเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ต่อมสุกรเพาะเลี้ยงได้เท่าๆ กับเชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์อื่น แต่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณต่ำกว่า
8. Full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเดิงกีที่ได้ทำการเปลี่ยนแปลงตามข้อถือสิทธิที่ 1

### บทสรุปการประดิษฐ์

เชื้อไวรัสเดิงกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 เป็นเชื้อไวรัสใช้เลือดออกเดิงกี ซึ่งถูกดัดแปลงโดยเทคนิคทางพันธุวิภาคกรรมทำให้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน rM ถูกเปลี่ยนแปลงจนส่งผลให้ไวรัสสายพันธุ์นี้ มีระดับโปรตีน rM บนผิวนุภาคที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ในปริมาณลดต่ำลงกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ โดยสามารถดักจับเชื้อไวรัสต้นตอได้มากกว่าเชื้อไวรัสเดิงกีตัวเดิม แต่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ได้น้อยกว่าเชื้อไวรัสต้นตอซึ่งก่อให้เกิดโรคใช้เลือดออกในคน